

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Ilmu dan Teknologi Pangan Universitas Muhammadiyah Malang. Penelitian dilaksanakan mulai dari awal studi pendahuluan sampai analisa data pada bulan Mei 2018 hingga Januari 2019.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah seperangkat alat-alat kaca (*glassware* IWAKI Pyrex), bola hisap, spatula, timbangan analitik merk Pioneer Ohaus PA413, *waterbath*, oven merk WTC Binder 7200 tipe E53 no.89749, pengering cabinet, kompor, panci, baskom, kain saring, pH universal, desikator merk Glasswerk Wertheim 6132, pH meter tipe Lab 875 (*S1 Analytics*), cawan porselen, viscometer RION-CO, kertas saring whatman, kain belacu, aluminium foil, hand refractometer tipe N1- α merk ATAGO, color reader CR-10 merk KONIKA MINOLTA, lemari asam, dan alat bantu lainnya.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rumput laut coklat (*Sargassum cristaefolium*) yang diperoleh dari Desa Cabbiya Kec. Talango Kab. Sumenep Madura dengan karakter rumput laut kering dengan panjang *thallus* ± 50 cm (Lampiran 28), bunga mawar lokal tabur dari pedagang di Pasar Besar Kota Malang, HCl 37% (teknis), etanol 96% (teknis), Na₂CO₃, dan aquades.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini melalui dua tahap yaitu tahap pertama ekstraksi alginat dari *Sargassum cristaefolium* dan tahap kedua yaitu aplikasi alginat dari perlakuan terbaik pada produk sirup sari mawar.

3.3.1 Penelitian Tahap 1

Penelitian ini menggunakan desain Rancangan Acak Kelompok (RAK) Faktorial dengan dua faktor. Faktor pertama yaitu konsentrasi Na_2CO_3 (N) (Natrium karbonat) yang terdiri atas 3 level perlakuan (5%; 6%; 7%) sedangkan faktor kedua adalah lama pemanasan (T) yang terdiri atas 3 level perlakuan (1.5 jam; 2 jam; 2.5 jam) sehingga diperoleh 9 kombinasi percobaan. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga diperoleh total perlakuan sebanyak 27. Parameter yang akan diamati pada produk alginat ekstrak dari rumput laut *Sargassum cristaefolium* adalah rendemen, kadar air, kadar abu, viskositas, pH, dan tingkat kecerahan (*Lightness*).

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan

N/t	N1	N2	N3
T1	N1T1	N2T1	N3T1
T2	N1T2	N2T2	N3T2
T3	N1T3	N2T3	N3T3

Setelah diperoleh data analisa, kemudian diolah secara statistic dengan bantuan *software Microsoft Excel* dan dilakukan uji Modus untuk menentukan perlakuan terbaik dari semua parameter. Perlakuan terbaik yang diperoleh dari uji Modus akan diaplikasikan ke dalam sirup sari mawar.

3.3.2 Penelitian Tahap II

Penelitian tahap kedua merupakan proses aplikasi alginat pada sirup sari mawar sebagai pengental dan penstabil yang diperoleh dari penelitian tahap pertama (perlakuan terbaik). Penelitian tahap kedua dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan sebagai berikut:

- S0 : alginat 0% (tanpa alginat)
- S1 : alginat perlakuan terbaik (N3T3) 0,5%
- S2 : alginat perlakuan terbaik (N3T3) 1%

Parameter yang akan diamati pada produksirup sari mawar adalah viskositas, kadar gula total, aktivitas antioksidan metode RSA (*Radical Scavenging Activity*) menggunakan DPPH, analisa total antosianin, vitamin C, dan uji hedonik (rasa, kenampakan, kekentalan, dan aroma).

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Ekstraksi Alginat

Ekstraksi alginat dari rumput laut *Sargassum cristaefolium* mengikuti metode Tambunan dkk. (2013) dengan Modifikasi, sampel rumput laut kering *Sargassum cristaefolium* ditimbang sebanyak 50 gram dan direndam dengan air tawar selama ± 3 jam setelah itu dicuci dengan air mengalir. Kemudian sampel direndam dalam larutan HCl 37% dengan konsentrasi 1% selama 1 jam, setelah itu dicuci dengan air mengalir. Rumput laut *Sargassum cristaefolium* dimasukkan kedalam *beaker glass* dan ditambahkan larutan Na_2CO_3 sesuai perlakuan dan dilakukan pemanasan dengan suhu 50°C sesuai perlakuan. Bubur rumput laut yang didapat dari hasil ekstraksi disaring menggunakan kain belacu. Filtrat yang

didapat kemudian dipucatkan dengan NaOCl 4% sebanyak 50 ml dan dilanjutkan penambahan larutan HCl 37% sebanyak 10% dari volume filtrat kemudian didiamkan selama 30 menit. Asam alginat yang terbentuk dicuci dengan air mengalir kemudian ditambahkan larutan Na₂CO₃ 10% sampai pH 7 yaitu terbentuk na-alginat. Na-alginat yang telah terbentuk kemudian dimurnikan dengan ethanol 96% dan didiamkan selama 30 menit. Setelah itu Na-alginat disaring dan dikeringkan menggunakan *cabinet dryer*. Na-alginat yang telah kering ditepungkan dengan blender hingga menjadi serbuk alginat yang berwarna putih kekuningan. Selanjutnya dilakukan analisa kualitas alginat yang meliputi kadar air, kadar abu, rendemen, viskositas, nilai pH, dan tingkat kecerahan.

3.4.2 Pembuatan Sirup Sari Mawar

Bunga mawar yang telah disortir dan diambil kelopaknya ditimbang sebanyak 30 gram, kemudian dicuci bersih dengan air. Sebelumnya memanaskan air 200 ml yang ditambahkan asam sitrat 0,5% hingga mendidih (100⁰C) untuk proses maserasi. Setelah itu, dicampurkan kedalam wadah berisi bunga. Bunga yang sudah disortir dan dibersihkan dimaserasi selama 25 menit. Setelah maserasi selesai, hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring. Kemudian sari mawar dan gula 60% dihomogenkan melalui pemanasan dengan suhu 50⁰C selama 5 menit. Larutan sari mawar dan gula tadi ditambahkan bubuk Na-alginat (yang diperoleh dari perlakuan terbaik penelitian tahap pertama) sesuai dengan perlakuan, lalu dilakukan pemanasan yang kedua dengan suhu 50⁰C selama 5 menit. Setelah homogen, kemudian didinginkan dan dikemas dalam wadah botol plastik.

3.5 Prosedur Pengamatan Parameter Penelitian

3.5.1 Rendemen (FCC, 2004)

Rendemen alginat yang diperoleh dari proses ekstraksi rumput laut *Sargassum sp.* dihitung berdasarkan berat setelah pengeringan terhadap berat kering bahan baku. Perhitungan kadar rendemen alginat menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rendemen (\%)} = (\text{b.alginat akhir} / \text{b.sampel}) \times 100\%$$

3.5.2 Analisa Kadar Air (Metode Oven) (AOAC, 2005)

Prinsip dari analisis kadar air metode oven adalah menguapkan air bebas (H₂O) yang ada didalam bahan pada suhu dan waktu tertentu, hingga diperoleh kadar air konstan. Adapun tahapan analisa kadar air sebagai berikut:

1. Botol vial dikeringkan dalam oven selama 24 jam dengan suhu 100-105⁰C.
2. Botol vial didinginkan dalam desikator selama 15 menit.
3. Botol vial ditimbang sebagai berat botol (A).
4. Bahan ditimbang sebanyak 2 gram ke dalam botol vial yang telah dikeringkan dan dicatat sebagai berat bahan dalam cawan (B).
5. Sampel dimasukkan ke dalam oven pada suhu 100-105⁰C selama 6 jam.
6. Sampel didinginkan dalam desikator selama 15 menit.
7. Sampel yang telah dingin ditimbang sebagai bobot akhir sampel (C).
8. Kadar air sampel dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar air (\%)} = ((A+B)-C) \times 100\%$$

3.5.3 Analisa kadar abu (AOAC, 2005)

Penentuan kadar abu adalah mengoksidasi senyawa organik pada suhu tinggi yaitu sekitar 500-600⁰C dan melakukan penimbangan zat yang tersisa

setelah proses pembakaran tersebut. Adapun tahapan analisa kadar abu adalah sebagai berikut:

1. Cawan dikeringkan dalam oven pada suhu 105⁰C selama 1 jam.
2. Cawan didinginkan selama 15 menit dalam desikator dan ditimbang.
3. Sampel 2 gram dimasukkan ke dalam cawan, kemudian dimasukkan ke dalam tanur yang suhunya 500-600⁰C selama 3 jam.
4. Cawan didinginkan dalam desikator.
5. Cawan dan abu ditimbang sehingga didapatkan berat konstan.
6. Kadar abu dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar abu (\%)} = ((\text{Berat abu} - \text{Berat kurs kosong}) / \text{Berat sampel}) \times 100\%$$

3.5.4 Viskositas (Yuwono E dan P. Sukardi, 2001)

1. Pangkal spindel yang sesuai dimasukkan pada lubang penghubung rotor.
2. Penghubung rotor dimasukkan ke dalam sampel.
3. Diatur kecepatan spindel dan tunggu hingga stabil.
4. Baca skala yang ditunjukkan.
5. Mengulang hal yang sama hingga didapatkan data yang valid.

$$\text{Viskositas (d.Pas)} = \text{Skala yang ditunjuk}$$

3.5.5 Penentuan Intensitas Warna Metode L, a, b Hunter (Yuwono, 2001)

1. Sampel disiapkan dalam plastik PP (transparan).
2. Color reader dihidupkan.
3. Dibaca nilai L, a, b yang tertera pada layar Colour reader dimana L adalah kecerahan (nilai positif (+) berarti cerah, nilai negatif (-) berarti suram), axis a (nilai positif (+) berarti merah dan nilai negatif (-) berarti hijau, axis b (nilai positif (+) berarti kuning dan nilai negatif (-) berarti biru).

3.5.6 Penetapan Total Gula Total Metode Anthrone (Kusnadi, 2014)

Preparasi sampel cair menggunakan sampel sebanyak 1 ml dilarutkan dalam 9 ml aquades pada erlenmeyer dan ditambah dengan CaCO_3 hingga mencapai pH 7. Erlenmeyer berisi sampel dipanaskan pada pendingin balik selama 30 menit. Larutan sampel disaring dengan kertas whatman no. 40 hingga mendapatkan rendemen yang jernih. Sampel yang sudah jernih diambil 1 ml untuk kemudian diencerkan hingga 5 kali pada tabung reaksi. Kemudian sampel diberi larutan anthrone secara cepat sebanyak 5 ml di dalam lemari asam. Panaskan sampel dalam tabung reaksi (ditutup dengan alumunium foil) yang sudah ditambahkan dengan anthrone selama 12 menit dalam gelas beaker berisi air mendidih. Sampel panas didinginkan terlebih dahulu, kemudian dipindahkan dalam kuvet dan baca absorbansi pada panjang gelombang 630 nm.

Sampel sirup diambil sebanyak 1 ml, kemudian dilarutkan pada aquades sebanyak 250 ml. Sampel tadi dimasukkan kedalam tabung reaksi sebagai blanko sebanyak 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 ml larutan glukosa standar. Tambahkan air kedalam tabung reaksi hingga sampel berisi 1,0 ml. Tambahkan dengan cepat 5,0 ml pereaksi anthrone ke dalam tabung reaksi di dalam lemari asam dan langsung tutup tabung reaksi dengan aluminium foil, kemudian campur larutan hingga homogen menggunakan vortex. Setelah itu mendidihkan air secukupnya dalam gelas beaker dengan pemanas hot plate. Setelah mendidih, masukkan tabung reaksi kedalam gelas beaker dan dipanaskan selama 12 menit. Setelah pemanasan berakhir, tabung reaksi didinginkan dengan air mengalir. Kemudian memindahkan larutan kedalam kuvet untuk pembacaan absorbansi dengan panjang gelombang

630 nm pada spektrofotometer. Setelah itu, membuat kurva hubungan antara nilai absorbansi dengan mg glukosa.

3.5.7 Analisa Aktivitas Antioksidan Metode RSA (Yue dan Xu, 2008)

Prinsip dari uji DPPH adalah penghilangan warna untuk mengukur kapasitas antioksidan yang langsung menjangkau radikal DPPH, yang dilihat dari absorbansi pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer. Adapun tahapan analisis antioksidan dengan metode DPPH sebagai berikut:

A. Pembuatan Larutan DPPH 0,25 mM

1. Serbuk DPPH dihitung dengan rumus:

$$\text{Konsentrasi} = \text{Massa (mg)} / (\text{Mr} \times \text{Vol (L)})$$

2. Serbuk DPPH dilarutkan dengan methanol 70% pada labu ukur 50 ml hingga batas tera, dan dihomogenkan.
3. Larutan DPPH disimpan pada kondisi gelap dan dingin, labu ukur harus tertutup rapat menggunakan aluminium foil dan harus segera digunakan.

B. Ekstraksi Bahan Aktif

1. Sampel ditimbang sebanyak 1 gram ke dalam *tube centrifuge*.
2. Larutan methanol 70% ditambahkan sebanyak 9 ml.
3. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 4000 *rpm* selama 10 menit.
4. Supernatan dipisahkan untuk uji aktivitas antioksidan.

C. Analisa Aktivitas Antioksidan

1. Supernatan diambil sebanyak 1 ml kedalam tabung reaksi.
2. Ditambahkan 2 ml larutan DPPH 0,25 Mm dan menghomogenkannya.
3. Tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil .
4. Sampel disimpan pada kondisi gelap selama 30 menit.

5. Dibaca serapan panjang gelombang dengan spektrofotometer *UV Vis* pada panjang gelombang 517 nm.
6. Dihitung % inhibisi dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = ((\text{Abs blanko} - \text{Abs sampel}) / \text{Abs blanko}) \times 100\%$$

3.5.8 Uji Total Antosianin dengan Metode *ph Differential* (AOAC, 2005)

Prinsip analisa kadar antosianin dengan metode perbedaan nilai pH adalah penentuan total antosianin monomer konten, berdasarkan perubahan struktur kromofor antosianin pada pH 1 dan pH 4,5. Pada pH 1, antosianin secara keseluruhan berbentuk kation flavillum atau oxonium yang berwarna. Sedangkan pada pH 4,5 antosianin berbentuk karbinol atau hemikal yang tidak berwarna.

A. Pembuatan Larutan *Buffer*

1. *Buffer* pH 1

Larutan KCl: 0,025 M KCl (1,86 gram dalam 980 ml aquades)

Untuk membuat *buffer* pH 1, sebanyak 980 ml KCl 0,025 M ditambahkan dengan 6,3 ml HCl 37%.

2. *Buffer* pH 4

Larutan Na-asetat: 0,4 M larutan Na-asetat (54,43 gram dalam 960 ml akuades)

Untuk membuat *buffer* pH 4,5, sebanyak 960 ml larutan Na-asetat 0,4 M ditambahkan dengan 20 ml HCl 37%.

B. Penentuan Antosianin

1. Sampel dilarutkan dalam pelarut methanol asam dengan perbandingan (1:1) kedalam *beaker glass*.
2. Larutan sampel dihomogenkan, dan ditutup seluruh bagian wadah dengan aluminium foil.

3. Dilakukan maserasi sampel ada suhu -23°C selama 1 jam.
4. Dimasukkan sebanyak 1 ml masing-masing kedalam 2 buah tabung reaksi.
5. Larutan *buffer* pH 1 sebanyak 9 ml ditambahkan pada tabung reaksi pertama dan tabung reaksi kedua ditambahkan larutan *buffer* pH 4,5 sebanyak 9 ml.
6. Dilakukan scanning antosianin dengan rentang panjang gelombang 400 nm- 550 nm pada kedua *buffer* larutan sampel ekstrak untuk mengetahui panjang gelombang maksimal antosianidin yang dimiliki oleh sampel ekstrak.
7. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimal dan panjang gelombang 700 nm pada masing-masing sampel dan hasilnya dikalkulasi berdasarkan persamaan berikut:

$$A = (A_{\text{vis-maks}} - A_{700\text{nm}})_{\text{nilaipH1}} - (A_{\text{vis-maks}} - A_{700\text{nm}})_{\text{nilaipH4,5}}$$

$$\text{Konsentrasi antosianin (mg/L)} = ((A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / \mathcal{E} \times l)$$

Keterangan:

A = Absorbansi

MW = *Molecular Weight* (Berat Molekul sianidin glukosida = 449,2)

DF = *Dillution factor* (faltar pengenceran= 10 ml/ 0,1 ml)

\mathcal{E} = Absortivitas molar/koefisien ekstingsi molar (29.600 L cm^{-1})

l = lebar kuvet (1 cm)

1.5.9 Uji pH (Badan Standarisasi Nasional, 2004)

Prinsip dari analisis pH dengan menggunakan pH meter adalah berdasarkan pengukuran potensial antara elektroda indikator dengan elektroda pembanding atau pengukuran aktivitas ion hidrogen secara potensiometri atau elektrometeri. Adapun tahapan analisis pH dengan menggunakan pH meter tipe Lab 875, sebagai berikut:

1. Alat pH meter dinyalakan.
2. Elektroda dibilas menggunakan akuades dan dikeringkan.
3. Dilakukan kalibrasi dengan mencelupkan elektroda pada larutan penyangga (pH 7) serta asam (pH 4) dan membersihkannya.
4. Elektroda dibilas kembali menggunakan akuades dan dikeringkan.
5. Elektroda dicelupkan pada sampel, dengan menekan tombol A (*hold*) dan *Enter* kemudian menunggu pembacaan pada layar stabil serta muncul indikator *autolock* pada layar.
6. Dicatat nilai yang tertera pada layar digital.

3.5.10 Uji Organoleptik (Rahayu, 2001)

Uji organoleptik yang dilakukan meliputi kenampakan, rasa, kesukaan dan tekstur. Pengujian menggunakan skala hedonik yang terdiri dari 5 skor dengan 3 pertanyaan dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 2. Skor Organoleptik

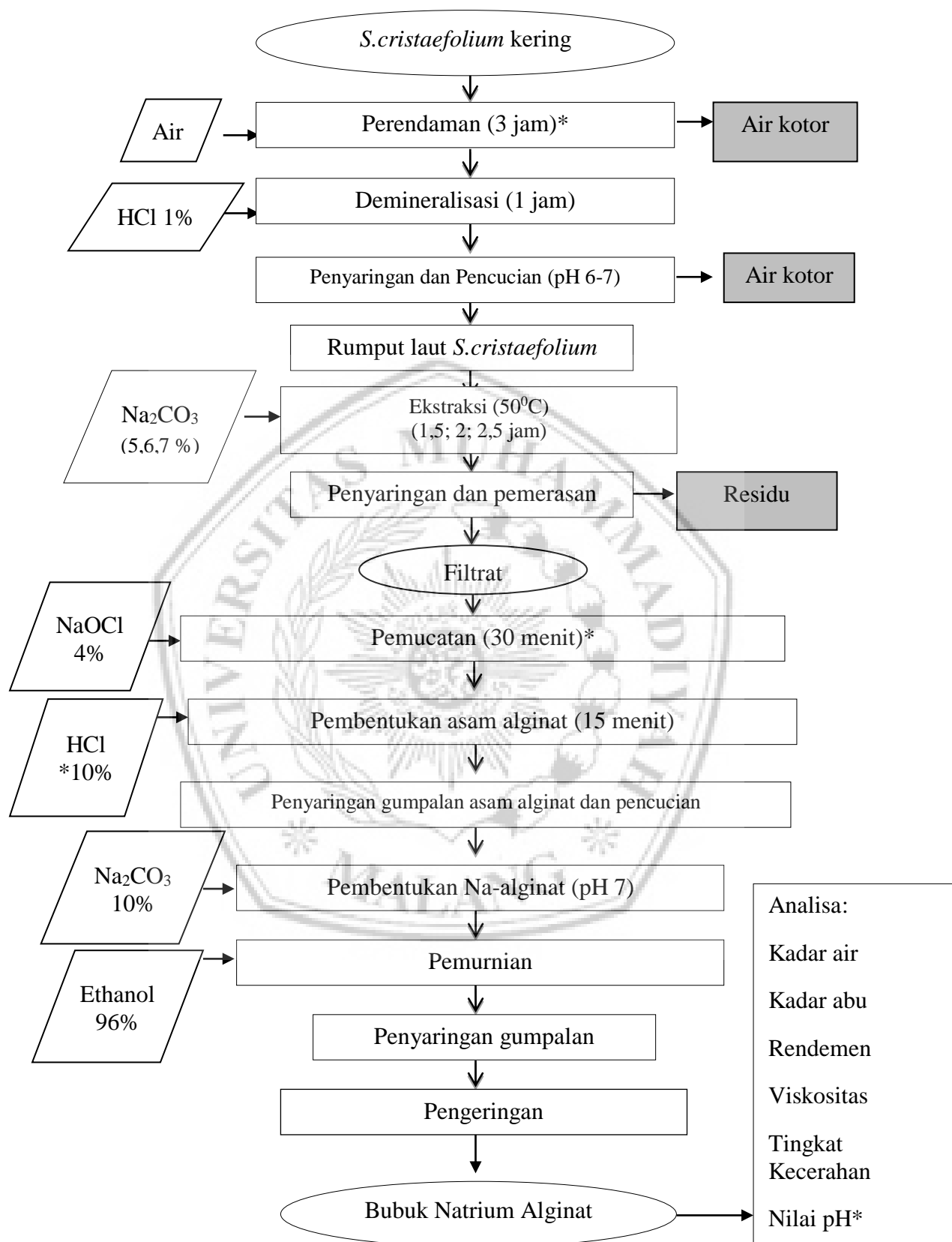
Skor	Rasa	Kekentalan	Aroma
1	Sangat Tidak Enak	Sangat Tidak Kental	Sangat Tidak Suka
2	Tidak Enak	Tidak Kental	Tidak Suka
3	Cukup Enak	Cukup Kental	Cukup Suka
4	Enak	Kental	Suka
5	Sangat Enak	Sangat Kental	Sangat Suka

3.6 Analisis Data

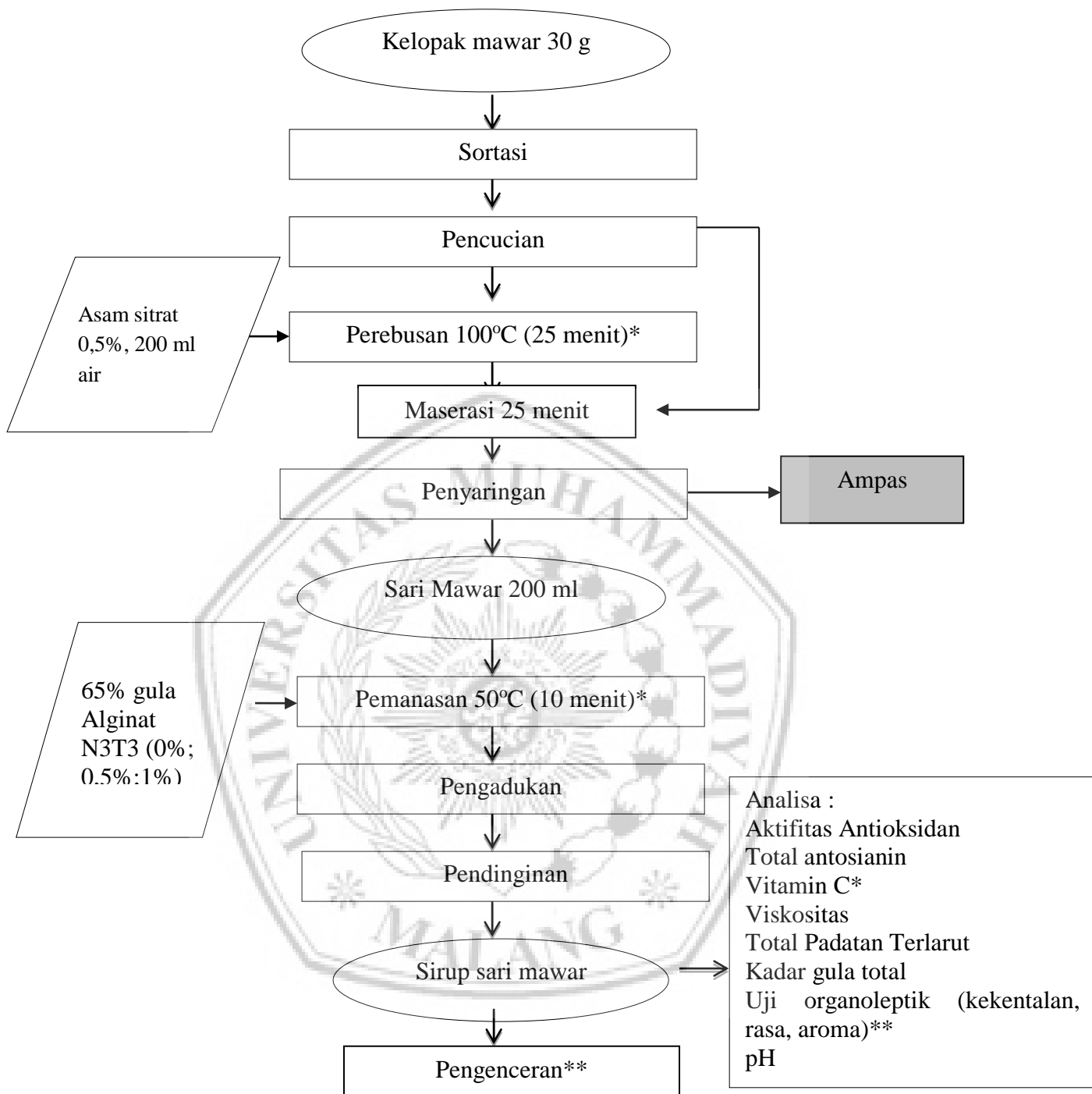
Pengolahan data pada penelitian tahap pertama menggunakan analisa ragam (ANOVA) dengan Uji Rancangan Acak Kelompok (RAK) Faktorial pada taraf 5%. Sedangkan pengolahan data pada penelitian tahap kedua menggunakan analisa ragam (ANOVA) dengan uji Rancangan Acak Lengkap (RAL) Sederhana pada taraf 5%. Apabila terjadi perbedaan nyata atau interaksi pada masing-masing perlakuan maka data yang sudah diperoleh akan dilanjutkan dengan uji pembeda

menggunakan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) pada taraf 5% dan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) pada taraf 5%. Perlakuan terbaik ditentukan dengan metode uji Modus (data yang paling sering muncul).





Gambar 1. Diagram Alir Proses Esktraksi Alginat dari *Sargasuum cristaefolium* (Tambunan dkk, 2013 dengan Modifikasi*)



Gambar 2. Diagram Alir 2 Proses Pembuatan Sirup Sari Mawar
(Prianto, 2018 dengan Modifikasi*)

Keterangan:

* = Modifikasi

** = uji organoleptik rasa dan aroma (10 ml sirup : 50 ml air)

○ = awal proses (bahan baku), akhir proses (produk)

▱ = Input proses (bahan penolong)

■ = Output (residu)

□ = Proses